



Expression and functional characterization of heparan sulfate 6-O-endosulfatases, sulfatase FP1 and sulfatase FP2

著者	長嶺 聖史
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 4075, 2006.3.24 Includes bibliographical references Includes supplementary treatise
発行年	2006
その他のタイトル	ヘパラン硫酸6-O-エンドスルファターゼであるスルファターゼFP1とスルファターゼFP2の発現と機能解析
URL	http://hdl.handle.net/2241/18137

[243]

氏 名 (本籍)	なが 長	みね 嶺	さと 聖	し 史	(沖 縄 県)
学 位 の 種 類	博	士	(医	学)	
学 位 記 番 号	博	甲	第	4075	号
学位授与年月日	平成	18	年	3	月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当				
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科				
学 位 論 文 題 目	Expression and functional characterization of heparan sulfate 6-O-endosulfatases, sulfatase FP1 and sulfatase FP2 (ヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼである スルファターゼ FP1 とスルファターゼ FP2 の発現と機能解析)				
主 査	筑波大学教授	医学博士	高	橋	智
副 査	筑波大学助教授	博士 (医学)	工	藤	崇
副 査	筑波大学助教授	博士 (獣医学)	杉	山	文 博
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	尾	崎	繁

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目 的)

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、細胞外シグナルを調節することにより細胞増殖、分化、形態形成を制御している。ヘパラン硫酸は多数の硫酸基で修飾されており、その多様な硫酸化パターンが細胞外シグナルの調節に重要である。筆者らの研究室で単離した新規のスルファターゼ *sulfatase FP1* (*SulfFP1*) は、ヘパラン硫酸の硫酸基を分解することにより硫酸化パターンを変化させ、細胞外シグナルを調節していると考えられた。そこで本論文では、*SulfFP1* 関連遺伝子である *sulfatase FP2* (*SulfFP2*) を単離し、その生化学的性質と発現及び機能を明らかにすることを目指した。

(対象と方法)

(1) *SulfFP2* 遺伝子の単離：*SulfFP1* の相同遺伝子産物間で保存されているアミノ酸配列をもとに degenerate primer を作成し、PCR 法により *SulfFP2 cDNA* の断片を得た。その断片をプローブとして *SulfFP2 cDNA* 全長を単離した。

(2) *SulfFP2* 蛋白の性質：*SulfFP2* 蛋白を培養細胞に強制発現させ、細胞内小器官のマーカーと免疫二重染色を行った。*SulfFP2* 蛋白のポリクローナル抗体を作成し、*SulfFP2* 発現細胞の培養上清を用いてウェスタンブロットを行った。*SulfFP2* 蛋白の切断部位を同定するため、精製した蛋白で N 末アミノ酸シーケンスを行った。切断部位に変異を導入した *SulfFP2* 蛋白を作成し、切断パターンの変化を確認した。

(3) *SulfFP2* の酵素活性：*SulfFP2* 蛋白を含む培養上清を人工基質 4-メチルウンベリフェリル硫酸 (4-MUS) と反応させ、蛍光強度を測定した。また、培養上清をヘパリン等と反応させ、ヘパリナーゼで二糖に分解した後、HPLC で二糖組成を分析した。ノックアウトマウスの脳からヘパラン硫酸を抽出し、同様な方法を用いて二糖組成を決定した。

(4) *SulfFP2*mRNA の発現：胎生期および成獣ラットの凍結切片を作成し、*in situ* ハイブリダイゼーション

を行った。また、成獣ラットの各臓器より total RNA を抽出し、ノーザンブロットを行った。

(5) *SulffFP1* と *SulffFP2* ノックアウトマウスの表現型解析：ES 細胞での相同組換えによりキメラマウスを作成し、単独ノックアウト (KO) マウスとダブル KO マウスを作成した。新生仔の大脳皮質運動野に Dil を注入して皮質脊髓路を標識した。

(結 果)

(1) *SulffFP2* 遺伝子の単離：スクリーニングにより 4172 塩基対の全長 cDNA が得られ、予想されるアミノ酸は 875 残基であった。

(2) *SulffFP2* 蛋白の性質：*SulffFP2* 蛋白はゴルジ体、小胞体に局在するが、リソソーム内には局在しなかった。また細胞表面や培養上清中にも蛋白が観察された。培養上清中では N 末断片と C 末断片に切断されていた。その切断部位は furin ファミリーの切断配列に相当し、furin 阻害剤により切断されない蛋白が増加した。また furin による切断のコンセンサス配列に変異を導入すると切断されなくなった。

(3) *SulffFP2* の酵素活性：*SulffFP2* 蛋白は 4-MUS に対してスルファターゼ活性を示し、その活性は Sulfatase modifying factors (SUMFs) の共発現により増強した。*SulffFP2* 蛋白は、中性 pH および生理的ナトリウム濃度にてより強い活性を示した。また、*SulffFP2* 蛋白は、*SulffFP1* 蛋白と同様に、ヘパリン内部のグルコサミンの 6 位の硫酸基を分解するエンドスルファターゼ活性を有していた。ノックアウトマウスの脳においてもヘパラン硫酸の二糖組成に変化が見られた。

(4) *SulffFP2*mRNA の発現：ラット胎児神経系において、海馬、中脳、網膜、脊髓フロアプレート等に強い発現が見られた。成獣ラット神経系において、海馬（特に CA3 錐体細胞）、大脳皮質、手綱核、網膜、脊髓灰白質に発現が見られた。また他の成獣臓器では、心臓、肺、小腸、肝臓、膀胱、精巣、卵巣において発現が見られた。

(5) *SulffFP1* と *SulffFP2*KO マウスの表現型解析：単独 KO マウスでは著明な異常は認められていないが、ダブル KO マウスは生後数日以内に死亡した。一部の個体で著明な水頭症が認められた。大脳皮質の形成は正常だったが、皮質脊髓路の走行異常が認められた。

(考 察)

SulffFP2 は、*SulffFP1* と高い相同性を有し、特徴的な親水性領域を有していたことから、*SulffFP1* とともに、スルファターゼ族の中でサブファミリーを形成していると考えられた。*SulffFP2* は、*SulffFP1* と同様に、細胞内ではゴルジ体、小胞体に局在し、細胞表面や細胞外にも存在していた。さらにヘパラン硫酸に対するエンドスルファターゼ活性を有していたことから、*SulffFPs* はヘパラン硫酸の生合成過程または細胞外にてヘパラン硫酸の硫酸化パターンを変化させ、細胞外シグナルを調節している可能性が高いと考えられた。*SulffFP2* は furin 等のプロテアーゼにより N 末断片と C 末断片に切断されていた。Furin は他の蛋白を切断して活性を調節するので、*SulffFP2* も切断により酵素活性が調節されている可能性が考えられた。*SulffFP2* の中枢神経系における発現パターンは、胎生期では *SulffFP1* と一部重複していたが、生後は異なるパターンを示していた。従って、*SulffFP1* と *SulffFP2* は成獣においては異なる機能を有する可能性が考えられた。ダブル KO マウスにおいて、大脳皮質の形成は正常だが皮質脊髓路の走行異常が見られたことから、*SulffFPs* が軸索ガイダンス因子の機能を制御している可能性が考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、*SulffFP2* がヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼ活性を有し、中枢神経系においては時間

的、空間的に特徴的な発現パターンを示すことを明らかにした。また欠損マウスの解析より、SulfFPs が皮質脊髓路の軸索ガイダンスや、その他の中枢神経系の形態形成において重要な役割を担っていることを報告しており、神経回路形成の分子メカニズムの一部を解明したものとして、高く評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。